

## ВЛИЯНИЕ СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ НА МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ ЛАВАНДЫ *IN VITRO*

©2013 Н.А. Егорова

Институт сельского хозяйства Крыма НААН Украины, г. Симферополь

Поступила 10.06.2013

Исследовано влияние компонентов питательной среды Мурасиге и Скуга на развитие меристемных культур лаванды (*Lavandula angustifolia* Mill.) на разных этапах клонального микроразмножения *in vitro*.

**Ключевые слова:** *Lavandula angustifolia*, клональное микроразмножение *in vitro*.

Лаванда узколистная (*Lavandula angustifolia* Mill.) является одной из наиболее распространенных эфиромасличных культур, выращиваемых на юге Украины. Широкое применение этого растения связано с наличием в его соцветиях эфирного масла, кумаринов, дубильных и других веществ [7]. Лаванда возделывается, главным образом, для получения эфирного масла, которое используется в пищевой и парфюмерно-косметической промышленности, в керамическом, лакокрасочном, фарфоровом производствах. В медицине его применяют как ранозаживляющее, успокаивающее и спазмолитическое средство.

Повышение эффективности селекционной и семеноводческой работы у лаванды в значительной степени может быть достигнуто за счет внедрения биотехнологических приемов создания и размножения нового селекционного материала. Одной из наиболее перспективных клеточных технологий является клональное микроразмножение, которое может использоваться для получения качественного оздоровленного посадочного материала, создания коллекций генетической плазмы *in vitro*, быстрого размножения ценных селекционных образцов и форм, созданных с применением методов культуры тканей. В литературе имеются данные об исследовании отдельных вопросов, связанных с размножением *in vitro*, у некоторых видов лаванды – *L. officinalis*, *L. dentate*, *L. latifolia*, *L. angustifolia*, *L. viridis*, *L. vera*, *L. pedunculata*, *L. spica* и лавандина [9-15, 17-18]. В качестве эксплантов авторы чаще всего использовали меристемы из пазушных и апикальных почек [10, 12] или сегменты стебля с узлом [9, 11, 14, 18]. В некоторых работах для размножения применяли индукцию адвентивного побегообразования из листьев или других органов [14, 17]. Для различных сортов и перспективных селекционных образцов *L. angustifolia* ранее нами была разработана методика микроразмножения с использованием культуры изолированных меристем [2-3].

Известно, что, несмотря на широкое практическое применение технологий микроразмножения у многих видов растений, имеется ряд проблем, сни-

жающих их эффективность. Это высокая генотипическая зависимость процессов морфогенеза *in vitro*, образование каллуса при культивировании меристем, витрификация побегов, низкая частота адаптации *in vivo* и другие [1, 5, 8]. Многие из перечисленных проблем, многоэтапность и большая трудоемкость процесса размножения в культуре тканей обуславливают высокую стоимость полученных растений. Дальнейшее совершенствование технологий размножения в изолированной культуре связано с исследованиями, направленными на повышение коэффициента размножения, сокращение этапов размножения, разработку методов культивирования в жидкой среде в биореакторах и других приемов. Достаточно важным вопросом является упрощение состава питательной среды и снижение ее стоимости, что в конечном итоге будет способствовать повышению эффективности биотехнологии и понижению себестоимости пробирочных растений. В связи с этим целью данной работы было изучение влияния различных компонентов питательной среды на развитие меристемных культур лаванды на разных этапах микроразмножения *in vitro*.

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Материалом для исследований служили ткани и органы лаванды узколистной (*Lavandula angustifolia* Mill.) сортов Степная, Синева и Вдала. В качестве первичных эксплантов использовали меристемы из апикальных и пазушных почек растений. Отрезки побегов стерилизовали с использованием 70% этанола и 50% препарата «Брадофен». При введении в культуру эксплантов, субкультивировании и приготовлении питательных сред применяли традиционные методики, принятые в работах по культуре ткани [4]. Выделение меристем проводили под микроскопом МБС-10 в условиях ламинарного бокса. Для размножения на 2-м этапе полученные из почек побеги разделяли на микрочеренки 7-8 мм с 1 узлом и парой листьев. Почки или микропобеги культивировали в пробирках на различных модификациях питательной среды Мурасиге и Скуга (МС) [16]. В качестве регуляторов роста в среду добавляли кинетин (К), гибберелловую кислоту (ГК), индолилмасляную кислоту (ИМК) (Sigma, США). Выращивание изолирован-

Егорова Наталья Алексеевна, д.б.н., старший научный сотрудник, зав. лабораторией, e-mail: yegorova.na@mail.ru

ных культур проводили на среде с добавлением 0,7% агар-агара или на жидкой среде на мостиках из фильтровальной бумаги. Продолжительность цикла выращивания составляла 1-1,5 мес. Культивирование осуществляли при температуре +26°C, 70% влажности и 16-часовом фотопериоде с освещённостью 2-3 тыс. лк. В процессе исследований определяли длину побегов и их число, количество узлов на побеге, частоту множественного побегообразования, каллусо- и ризогенеза, витрификации побегов (%). Коэффициент размножения (К.Р.) рассчитывали как количество микрочеренков, которое можно получить за 1 цикл выращивания, для этого среднее количество образующихся на экспланте побегов умножали на среднее число узлов на побеге. Все опыты проводили в 2-3-кратной повторности, в каждом варианте анализировали не менее 20 эксплантов. Экспериментальные данные обрабатывали с помощью традиционных методов статистического анализа с использованием пакета программ Microsoft Office (Excel 2003).

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенных нами ранее исследований было показано, что у изученных сортов лаванды при культивировании меристем из пазушных и верхушечных почек побегов необходимы 4 традиционные этапа микроразмножения [3]. Установлено, что на 1-м этапе введения в культуру и особенно на 2-м (собственно микроразмножение), наряду с формированием 1-2 основных побегов, происходило активное развитие адвентивных почек и побегов. Подобраны питательные среды и условия для разных этапов размножения, обеспечивающие высокий коэффициент размножения, частоту укоренения побегов (до 88%) и адаптации растений *in vivo* (до 97%). Показано, что среды с добавлением БАП или ауксинов индуцировали, наряду с множественным побегообразованием, развитие каллуса с частотой до 47-100%, а добавление в питательную среду зеатина привело к снижению основных показателей развития меристем. Согласно полученным нами данным, наиболее подходящим для развития меристемных культур лаванды на 1-2 этапах было добавление в среду МС 0,5-1,0 мг/л кинетина и 0,1-0,5 мг/л ГК. На этих средах на 2-м этапе отмечали развитие из микрочеренков основного побега длиной 20-30 мм с 4-5 узлами и до 10-14 дополнительных побегов.

Полученные результаты свидетельствуют о возможности использования для размножения лаванды нескольких методов – микрочеренкования побегов, индукции пазушных и адвентивных побегов, что позволяет существенно повысить коэффициент размножения (до 15-67 за цикл, в зависимости от генотипа и цикла размножения). При анализе особенностей морфогенеза меристемных культур *L. angustifolia* было показано влияние сезона, генотипа и цикла микроразмножения. Установлено, что в течение первых трех циклов микрочеренкования у

всех изученных сортов и образцов происходило значительное увеличение числа дополнительных побегов, вследствие этого коэффициент размножения в 3-4 м циклах достигал максимального значения (до 35-67 у разных сортов и образцов), затем наблюдалось постепенное снижение, а после 7 цикла стабилизация этого показателя.

В дальнейшем с целью повышения эффективности разработанной методики размножения *in vitro* были проведены исследования, направленные на упрощение состава питательной среды. Одним из самых дорогостоящих компонентов питательной среды является агар-агар, поэтому исключение его из состава для снижения стоимости и упрощения технологии микроразмножения является весьма привлекательным. Кроме того, у некоторых видов растений было показано преимущество использования жидкой среды, на которой происходило более интенсивное развитие меристем по сравнению с агаризованной [6, 8]. Поэтому нами было проведено сравнительное исследование влияния консистенции питательной среды (жидкая и агаризованная) на развитие меристемных культур лаванды сорта Степная на 2 и 3-м этапах микроразмножения (собственно размножение и укоренение). Как видно из представленных данных, на 2-м этапе размножения использование жидкой среды способствовало лучшему росту побегов и более активному адвентивному побегообразованию (табл. 1). Однако при этом формировалось 72,3% оводненных побегов. На этапе укоренения удаление из состава среды МС364 (½ МС+0,5 мг/л ИМК) агар-агара оказало более негативное воздействие. На этой среде наблюдали снижение почти в 4 раза частоты укоренения, а также ухудшение других морфометрических показателей и развитие 80% витрифицированных побегов. В некоторых работах по микроразмножению лаванды авторы также указывали на развитие оводненных побегов, которое зависело от концентрации солей, гормонов, сахарозы и агар-агара [9, 14, 15, 18]. Полученные нами данные свидетельствуют о нецелесообразности использования у лаванды жидких питательных сред, поскольку это, прежде всего, приводит к интенсивному формированию оводненных побегов, непригодных для дальнейшего культивирования.

С целью повышения эффективности технологии микроразмножения лаванды *in vitro* также была исследована возможность упрощения состава питательной среды Мурасиге и Скуга для 2-го этапа микроразмножения за счет снижения концентраций или исключения отдельных компонентов. Для проведения экспериментов предварительно были получены меристемные культуры лаванды сортов Синева, Степная, Вдала. На 2-м этапе размножения развившиеся побеги черенковали, а микрочеренки пересаживали на питательные среды разного состава. В качестве контроля была использована разработанная ранее оптимальная для этого этапа пита-

тельная среда МС418, содержащая 0,5 мг/л К и 0,1 мг/л ГК (табл. 2).

**Таблица 1.** Влияние консистенции питательной среды на развитие меристемных культур лаванды сорта Степная на разных этапах микроразмножения *in vitro*

Этап размножения	Питательная среда	Длина побега, мм	Количество узлов, шт./побег	Количество побегов, шт./эксплант	Частота образования, %		Частота витрификации побегов, %
					адвентивных побегов	корней	
2	МС418 агаризованная	14,5±1,0	2,2±0,2	4,2±0,6	87,5±7,2	0	0
	МС418 жидкая	17,2±1,2	3,2±0,3	7,9±1,0	100,0	0	72,3±6,6
3	МС364 агаризованная	19,3±1,1	4,2±0,3	1,3±0,2	0	75,0±7,8	2,9±0,3
	МС364 жидкая	12,7±1,0	2,4±0,2	1,9±0,3	0	18,1±2,0	80,0±7,8

**Таблица 2.** Влияние состава питательной среды на развитие меристемных культур лаванды сорта Степная на 2-м этапе микроразмножения

№ питательной среды	Состав питательной среды	Длина побега, мм	Количество узлов, шт./побег	Число побегов, шт./эксплант	Частота множественного побегообразования, %	К.Р.
МС418	МС + К(0,5 мг/л)+ГК (0,1мг/л); сахара 2%	13,3±1,0	2,2±0,2	5,2±0,6	100,0	11,4±1,2
МС43	½ МС + К(0,5 мг/л)+ГК (0,1мг/л); сахара 2%	12,6±0,9	2,2±0,2	4,8±0,5	100,0	10,6±1,1
МС44	½ МС + К(0,5 мг/л)+ГК (0,1мг/л); сахара 1%	12,2±1,1	1,8±0,1	6,3±1,2	100,0	11,3±1,1
МС45	МС418; исключен инозит	12,6±1,3	2,3±0,3	4,4±1,0	87,7±7,5	10,1±0,8
МС46	МС418; исключены глицин и витамины	12,1±0,9	2,3±0,2	3,7±0,4	75,0±7,2	8,5±0,9
МС48	МС418; исключена сахароза	10,9±2,1	2,2±0,4	1,8±0,2	66,7±5,9	4,0±0,5
МС50	½ МС + К(0,5 мг/л)+ГК (0,1мг/л); сахара 1%; никотиновая кислота и пиридоксин – по 0,25 мг/л; тиамин – 0,05 мг/л; исключены глицин, инозит	12,3±1,1	2,3±0,3	4,6±1,0	92,3±9,1	10,6±0,9

Как видно из представленных данных, снижение вдвое концентрации макро- и микроэлементов в питательной среде (МС43) или одновременное уменьшение концентрации сахарозы до 1% (МС44) достоверно не повлияло на развитие побегов из микрочеренков и на коэффициент размножения. Исключение из состава среды инозита (МС45), витаминов и аминокислоты глицина (МС46) привело к снижению до 75% частоты множественного побегообразования, количества побегов на эксплант и К.Р., однако эти различия также были статистически недостоверны. Отрицательное действие на развитие культур, особенно на способность микрочеренков к адвентивному побегообразованию, оказало исключение из состава среды сахарозы (МС48). В этом варианте опыта К.Р. снизился почти в 3 раза по сравнению со средой МС418. Развивающиеся побеги были очень слабыми и имели желто-бурую окраску. И хотя для

формирующихся побегов меристемных культур свойственно автотрофное питание (в отличие от большинства гетеротрофных каллусных тканей), по-видимому, для развития нормальных побегов и заложения адвентивных почек важно присутствие в среде сахарозы, как основного источника углерода. На основе анализа полученных данных была разработана модификация питательной среды МС50, в которой были вдвое снижены концентрации солей, сахарозы, витаминов и исключены инозит и глицин. Такое изменение состава среды достоверно не повлияло на изученные морфометрические показатели – длина и число побегов, частота множественного побегообразования, количество узлов и К.Р. были почти такие же, как и на контрольной среде. У сортов Синева и Вдала были получены аналогичные данные, свидетельствующие о возможности исключения некоторых компонентов из состава среды МС. На рис. представлено изменение наибо-

лее важного показателя (коэффициента размножения) на данных модификациях сред у этих сортов,

при этом у 'Синева' на среде МС46 наблюдалось даже незначительное повышение К.Р. до 14,9.

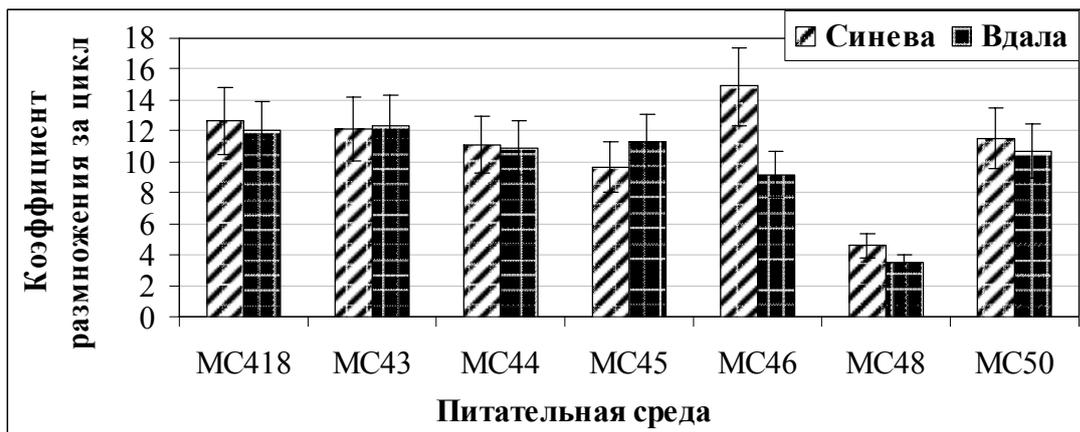


Рис. Влияние состава питательной среды на коэффициент размножения на 2-м этапе микроразмножения лаванды *in vitro*

Таким образом, в результате проведенных исследований были выявлены особенности влияния отдельных компонентов питательной среды на развитие меристемных культур некоторых сортов лаванды узколистной. При культивировании меристем и микрочеренков нами была использована наиболее распространенная среда Мурасиге и Скуга, которая также применялась многими авторами для выращивания разных типов эксплантов лаванды с целью микроразмножения *in vitro* [10, 11, 14]. Имеющиеся литературные данные, касающиеся гормонального состава питательных сред для размножения видов *Lavandula* довольно разнообразны. Так, у *L. viridis* и *L. pedunculata* было показано преимущество введения в среду БАП [11, 18], у *L. officinalis* – БАП и ИУК [10], у *L. dentate* – БАП и ИМК [12], у *L. vera* и *L. angustifolia* – тидиазурона [14] или исключения гормонов из среды [13]. Для изученных нами сортов *L. angustifolia* было установлено, что оптимальной для микроразмножения была среда МС с добавлением 0,5 мг/л кинетина и 0,1 мг/л ГК. Во многих зарубежных работах на разных этапах размножения у видов лаванды использовали твердую питательную среду, содержащую от 0,7% [14] до 1% [10] агар-агара, и до 3-4% сахарозы [14, 15]. Рядом авторов была выявлена необходимость снижения в два [10, 11] или даже четыре раза [14] содержания микро- и макроэлементов в среде МС, что способствовало уменьшению каллусообразования и витрификации побегов. Особенно часто такой прием у лаванды и других растений использовался для укоренения микропобегов *in vitro* [5, 8, 10, 14]. В отличие от проведенных для разных видов лаванды исследований, наши экспериментальные данные показали не только возможность, но и целесообразность исключения из состава среды МС на 2-м этапе микроразмножения *L. angustifolia* отдельных компонентов (глицина, инозита) и снижения вдвое концентрации макро- и микроэлементов, сахарозы и витаминов. Предлагаемая модификация состава питательной среды

позволяет без существенного изменения основных показателей развития меристемных культур не только уменьшить стоимость среды и, следовательно, размноженных растений, но и в целом упростить и повысить эффективность методики клонального микроразмножения лаванды.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. 160 с.
2. Егорова Н.А. Микроразмножение лаванды *in vitro* // Вестник Харьковского нац. аграр. ун-та. 2002. № 9 (1). С. 65-71.
3. Егорова Н.А. Получение растений-регенерантов в каллусной культуре лаванды и их микроразмножение *in vitro* (метод. рекомендации). Симферополь: ИЭЛР УА-АН, 2008. 28 с.
4. Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. Киев: Наукова думка, 1980. 488 с.
5. Кушнір Г.П., Сарнацька В.В. Мікротклональне розмноження рослин. Теорія і практика. Киев: Наукова думка, 2005. 270 с.
6. Митрофанова И.В. Регенерация *in vitro* микропобегов из вегетативных почек зизифуса китайского (*Zizyphus jujube* Mill.) и физические факторы культивирования // Бюлл. ГНБС. 2003. Вып. 87. С. 63-66.
7. Назаренко Л.Г., Афонин А.В. Эфираносы юга Украины. Симферополь: Таврия, 2008. 144 с.
8. Хасси Г. Размножение сельскохозяйственных культур *in vitro* // Биотехнология сельскохозяйственных растений. М.: Агропромиздат, 1987. С. 105-133.
9. Andrade L.B., Echeverrigaray S., Fracaro F. et al. The effect of growth regulators on shoot propagation and rooting of common lavender (*Lavandula vera* DC) // Plant Cell Tissue Org. Cult. 1999. V. 56. N 2. P. 79-83.
10. Chishti N., Kaloo Z.A., Shawl A.S., Sultan Ph. Rapid *in vitro* clonal propagation of *Lavandula officinalis* chaix a multipurpose plant of industrial impotence // Pakistan J. Biol. Sciences. 2006. N 9. P. 514-518.
11. Dias M.C., Almeida R., Romano A. Rapid clonal multiplication of *Lavandula viridis* L'Her through *in vitro* axillary shoot proliferation // Plant Cell Tissue Org. Cult. 2002. V. 68. N 1. P. 99-102.

12. Echeverrigaray S., Basso R., Andrade L.B. Micropropagation of *Lavandula dentata* from axillary buds of field-grown adult plants // Biol. Plantarum. 2005. V. 49. N 3. P. 439-442.
13. Ghiorghita G., Maftai D.E., Nicuta D. Some aspects concerning the *in vitro* reaction of *Lavandula angustifolia* L. // Propag. Ornament. Plants. 2009. V. 9. N 1. P. 47-49.
14. Hamza A.M., Oaima M. Abd El-Kafie, Kasem M.M. Direct micropropagation of English lavender (*Lavandula angustifolia* Munstead) plant // J. Plant Production, Mansoura Univ. 2011. V. 2. N 1. P. 81-96.
15. Lucchesini M., Pacifici S., Tognoni F. et al. Optimisation of *in vitro* cultural conditions of some officinal species // Acta Hort. 2006. N 723. P. 6-10.
16. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. 1962. V. 15. N 3. P. 473-497.
17. Xian Ri Li, Eun-Soo Seong, Il-Seop Kim, Chang-Yeon Yu. Micropropagation and RAPD analysis of somaclonal variants in *Lavandula spica* cv. Marino // Korean Jour. Med. Crop Sci. 1999. V. 7. N 2. P. 94-100.
18. Zuzarte M.R., Dinis A.M., Cavaleiro C. et al. Trichomes, essential oils and *in vitro* propagation of *Lavandula pedunculata* (Lamiaceae) // Industrial Crops and Products. 2010. N. 32. P. 580-587.

## INFLUENCE OF NUTRIENT MEDIUM COMPOSITION ON THE LAVENDER MICROPROPAGATION *IN VITRO*

©2013 N.A. Yegorova

Institute of Agriculture of Crimea of NAAS of Ukraine, Simferopol

The influence of constituents of Murashige and Skoog nutrient medium on the development of meristem cultures of lavender (*Lavandula angustifolia* Mill.) on the different stages of clonal micropropagation *in vitro* were investigated.

**Key words:** *Lavandula angustifolia*, clonal micropropagation *in vitro*.